



(19) KG (11) 1116 (13) C1 (46) 29.11.2008

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ПАТЕНТНАЯ СЛУЖБА
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(51) G01N 15/05 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)**

(21) 20050101.1

(22) 08.11.2005

(46) 29.11.2008, Бюл. №11

(76) Мамасаидов А.Т., Мурзалиев А.Д., Юсупов Ф.А., Мамасаидова Г.М., Сакибаев К.Ш., Шакиров М.Ю., Баймырзаева Г.О. (KG)

(56) Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. – М.: Литтерра, 2004. – С. 267

(54) Способ иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и ревматологии. Задачей изобретения является повышение чувствительности и эффективности иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома. Задача решается способе иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома, включающем исследование реакции В-лимфоцитов, где из исследуемой венозной крови выделяют В-лимфоциты, инкубируют их с кардиолипином, вносят люминесцирующую сыворотку, коньюгированную с флюоресцеинизотиоционатом, регистрируют уровень флюоресценции и рассчитывают коэффициент кардиолипинзависимого синтеза иммуноглобулинов и при значении коэффициента равном 200 усл.ед. и более, определяют развитие антифосфолипидного синдрома. Данный способ иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома может быть применен, наряду с традиционными методами, в медицине, а именно в иммунологии и ревматологии, в частности, в диагностике АФС. 1 н. п. ф-л, 3 пр.

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и ревматологии.

Известен способ иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома (АФС), заключающийся в обнаружении биологической ложноположительной реакции Вассермана (БЛПРВ). Проведение реакции Вассермана (РВ) основано на феномене связывания комплемента с кардиолипиновыми трепонемными антигенами. Обнаружение БЛПРВ говорит о наличии антифосфолипидных антител и может свидетельствовать об АФС.

При проведении РВ чаще всего используют Venereal Disease Research Laboratory антиген (VDRL-антigen) или «реагиновый» антиген, состоящий из кардиолипина (КЛ), фосфатидилхолина и холестерина в соотношении 1:10:30. Холестерин исполняет роль стержня, вокруг которого слоями располагаются фосфатидилхолин и КЛ. Кардиолипин является обязательным компонентом «реагинового» антигена, с которым и проводится стандартный VDRL-тест (Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. – М.: Литтерра, 2004. – С. 209-210, 253).

Известно, что БЛПРВ можно обнаружить у 20-60% больных с АФС и то в достаточно низком титре (Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. – М., 2004. – С. 181-182; Решетняк Т.М., Александрова З.С., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Клинико-иммунологические аспекты антифосфолипидного синдрома // Вестник РАМН – 2003. – №7 – С. 31-34).

(19) KG (11) 1116 (13) C1 (46) 29.11.2008

Учитывая последнее, а также применение РВ и для диагностики сифилиса можно сделать вывод о недостаточной чувствительности и специфичности этого иммунологического метода диагностики АФС.

Также известен способ иммунологической диагностики АФС, основанный на обнаружении IgG-антител к кардиолипину (IgG-аКЛ) твердофазным иммуноферментным методом, при котором на плашках с кардиолипиновыми липосомами адсорбируются IgG-аКЛ из сыворотки больных (Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром – М., 2004. – С. 210-211), при этом у больных с АФС IgG-аКЛ обнаруживаются в 43,6-80,0% случаев (Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. – М., 2004. – С. 224-228).

Также следует отметить то, что IgG-аКЛ может обнаруживаться у 7-61% больных с различными ревматическими заболеваниями (Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром – М., 2004. – С. 267).

Вышеуказанное свидетельствует о невысокой чувствительности и специфичности данного метода.

Задачей изобретения является повышение чувствительности и эффективности иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома.

Задача решается в способе иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома, включающем исследование реакции В-лимфоцитов, где из исследуемой венозной крови выделяют В-лимфоциты, инкубируют их с кардиолипином, вносят люминесцирующую сыворотку, коньюгированную с флюоресцеинизотиоционатом, регистрируют уровень флюоресценции, рассчитывают коэффициент кардиолипинзависимого синтеза иммуноглобулинов и при значении коэффициента равном 200 усл.ед. и более, определяют развитие антифосфолипидного синдрома.

Сущность изобретения заключается в определении синтеза внутриклеточных иммуноглобулинов В-лимфоцитами периферической крови (ИГВЛ) в присутствии специфического антигена этой болезни – кардиолипина.

Способ иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома осуществляют следующим образом.

Лимфоциты выделяют из периферической венозной крови, стабилизированной антикоагулянтом, на градиенте плотности 1,007 г/см³ верографин-фиколл. С помощью пастеровской пипетки аккуратно наслаживают цельную стабилизированную антикоагулянтом кровь в объеме 4 мл на градиент, избегая смешивания градиента и крови. Затем центрифугируют при 1500 об/мин в течение 30 минут. При этом эритроциты и гранулоциты оседают на дно пробирки, а на границе раздела градиента и крови находятся мононуклеарные клетки. По всей площади сечения пробирки на границе раздела фаз отсасывают пастеровской пипеткой слой мононуклеаров (плотное облачко над смесью). Тщательно собранный слой мононуклеаров (состоящий из лимфоцитов) переносят в чистую центрифужную пробирку. Выделенные клетки дважды отмывают от плазмы средой 199, центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 минут. Надосадок отбрасывают, а лимфоциты ресусцидируют 1,0 мл средой 199. По 0,5 мл суспензии лимфоцитов вносят в две центрифужные пробирки (контроль и опыт) со средами следующего состава.

В первой пробирке (опытная) питательная среда, состоящая из среды 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота, L-глутамина (300 мг/мл) и гентамицина (0,08 мг/мл), с добавлением антигена. В качестве антигена использовали 0,1 мл КЛ (из комплекса диагностикума «Антиген кардиолипиновый для реакции микропреципитации» производства Харьковского предприятия по выпуску бактериальных препаратов). Использовали КЛ в разведении 1:50.

Во второй пробирке (контрольная) питательная среда с добавлением 0,1 мл физиологического раствора.

Обе пробы сразу помещают в термостат при температуре 37°C, с влажной камерой. Пробы инкубировали 2 часа в герметически закупоренных центрифужных пробирках.

После инкубации пробы центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 минут, надосадок убирают, а лимфоциты ресусцидируют 2 каплями среды 199. После чего получают монослои лимфоцитов по методу А.Н. Красюка (А.с. SU №1174033, кл. A61K 39/00, 1985). Каплю густой свежевыделенной суспензии лимфоцитов наносят на два чистых обезжиренных предметных стекла (контроль и опыт), инкубируют во влажной камере при комнатной температуре 3-5 мин, после чего не прилипшие клетки смывают средой 199.

В результате на стекле остается четко сформированное пятно клеточного монослоя жизнеспособных клеток. Сразу после получения монослоя его фиксируют 70% раствором этанола в течение 10 минут. После фиксации препарата промывают средой 199, подсушивают и окрашивают

люминесцирующей сывороткой против глобулинов человека, коньюгированной с флюоресцеин-зотиоционатом (ФИТЦ-сыворотка), производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея. После окрашивания и тщательного отмывания от несвязавшихся белков и ФИТЦ стекла подсушивают и проводят количественную цитофлюориметрию (КЦФ) методом (Бененсон Е.В., Дай Е.Г. // Открытия и изобретения. – 1987, бюлл. 29. – А.с.СУ №1328757) на базе микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ, используя фотометрическую приставку ФМЭЛ-1. Источником возбуждающего излучения служит лампа ДРК-120, дающая стабильный разряд. Источник устанавливают по варианту освещения сверху.

Световыделительная система устанавливается по темнопольному варианту с темнопольным ОПАК-объективом малого увеличения 9x0,20 для обеспечения максимальной «скрещенности».

Регистрация интенсивности люминесценции осуществлялась на ФЭУ-39А с базовым напряжением усилительного комплекса 1000-1500 вольт с выдачей результата на цифровой вольтметр в регистре 2-20 вольт. Линейность зависимости фототока от интенсивности люминесценции в данном диапазоне измерений и стабильности разряда источника излучения контролировались измерениями флюоресценции эталонных урановых стекол с толщиной 2,3 мм, при этом величина отношения интенсивности флюоресценции этих эталонов в области 530 нм оставалась постоянной изо дня в день.

Измерение иммуноглобулинсинтезирующей функции лимфоцитов проводят в области 530 нм. Помимо суммарной флюоресценции на том же участке препарата измеряют суммарное светорассеивание, используя для этого комбинацию невозбуждающих флюоресценцию светофильтров МС-1 и НС-10.

Светорассеивание при выбранных условиях измерений линейно отражает клеточную плотность монослоя, поэтому отношение суммарной флюоресценции к светорассеиванию есть средняя флюоресценция на плоскости монослоя, или величина, отражающая уровень иммуноглобулинов на одну клетку в изучаемой лимфоидной популяции. Учитывая, что сила разряда лампы источника не является строго постоянной величиной и, следовательно, интенсивность флюоресценции может меняться от серии опытов к серии, вводят поправку к величине суммарной флюоресценции, измеряя в каждой серии определений флюоресценции эталонного уранового стекла толщиной 2,3 мм (Фэ). Отсюда среднюю флюоресценцию (Ф) плотности монослоя вычисляли по соотношению:

$$\Phi_{cp} = \frac{\Phi}{C} \times \Phi^o$$

где, Φ – флюоресценция монослоя,
 C – светорассеивание предметного стекла.

Данное соотношение отражает среднее количество внутриклеточных иммуноглобулинов, связанных с лимфоидной клеткой.

Затем, сравнивая уровень флюоресценции лимфоидных клеток в опыте и контроле (Фопыт и Фконтроль) выводили коэффициент КЛ-зависимого синтеза внутриклеточных иммуноглобулинов В-лимфоцитами по формуле:

$$КЛИГВЛ = \frac{\Phi_{опыт}}{\Phi_{контроль}} \times 100 \text{ усл. ед.}$$

Пример 1.

Больная С., 22 года. Жалобы на приступы потери сознания, сопровождающиеся клонико-тоническими подергиваниями в конечностях, прикусом языка, выделением пены из рта, периодически – непроизвольным мочеиспусканием и постприпадочным сном. Считает себя больной с осени 1995 года, когда впервые без причины появились подобные приступы, не лечилась. Весной 1997 после фактора переохлаждения появились боли в мелких суставах кистей, принимала индометацин с переменным успехом. Летом этого же года развилась лимфаденопатия, была обследована, найдены LE-клетки. Диагностирована СКВ, лечилась у ревматолога по месту жительства. В 1998 году – преждевременные роды, в 1999 г. – самопроизвольный аборт на сроке 4 недели. С октября 1999 г. приступы участились, усилились боли в суставах.

Объективно. Несколько заторможена, эритема над мелкими суставами кистей и коленными, генерализованная лимфаденопатия. Притупление перкуторного звука ниже угла лопатки справа, здесь же не проводится дыхание. Печень выступает из-под реберной дуги на 3 см, также отмечается увеличение селезенки – выступает на 4 см из-под реберной дуги.

Анализы крови. Нв 86 г/л, Эр. – $3,4 \times 10^{12}/\text{л}$, Л. – $3,2 \times 10^9/\text{л}$, СОЭ 56 мм/час. Тромбоциты $100 \times 10^9/\text{л}$, СРБ++++, сиаловые кислоты 410 ед., серомукоид 360 ед., общий белок 60 г/л, а-гл. – 30%, у-гл. – 58%, LE-клетки – 16 на 1000 лейкоцитов. ЦИК – 130 ед., АНФ титр 1:64.

Диагноз: АФС (поражения ЦНС, генерализованное сетчатое ливедо, тромбоцитопения) на фоне СКВ хронического течения, II степени активности.

Для подтверждения диагноза АФС у данной больной были проведены РВ, определение IgG-аКЛ и определение уровня КЛИГВЛ. Результаты были следующими: РВ – отрицательна, IgG-аКЛ на уровне 22 GPL (что не достигает патогенетически значимого уровня), КЛИГВЛ – 226,6 усл.ед.

Этот пример показывает, что у больной с явными клиническими признаками АФС данные определения РВ и IgG-аКЛ не подтвердили этот диагноз. Только определение уровня КЛИГВЛ, оказавшись более чувствительным, смогло уточнить наличие АФС.

Пример 2.

Больная М., 38 лет. Диагноз: СКВ, острое течение, III степень активности. Дерматит. Нефрит с нефротическим синдромом и артериальной гипертензией. ХПН I ст. Серозит (плеврит, перикардит). Кардит. Артрит. Анемия. Алопеция. Тромбоцитопения.

Жалобы на боли в суставах кистей, отеки лица, боль в области сердца и грудной клетки справа, сухой кашель, одышку, лихорадку до 38°C , выпадение волос, похудание на 10 кг, головные боли по всей поверхности головы больше по утрам, нарушение движения в правой руке и нижних конечностях, задержку мочи. Заболела 1,5 года назад, когда появилась эритема на лице («бабочка»), боли и припухлость мелких суставов кисти, постоянная лихорадка до $38,5^{\circ}\text{C}$. Через 3 месяца боли в грудной клетке и области сердца, сердцебиение, выпадение волос и изменения в анализах мочи (протеинурия). Был выставлен диагноз СКВ. Получала преднизолон и азатиоприн 50 мг в сутки, затем по 100 мг. Последнее ухудшение наступило месяц назад на фоне приема преднизолона и азатиоприна. Ухудшение самочувствия в течение последних 3-х недель. Больная начала замечать затруднения мочеиспускания и в течение 2-х недель нарушились движения в нижних конечностях, возникло чувство онемения в них. Начала беспокоить головная боль, периодически – тошнота.

Объективно. Состояние тяжелое. Бледность кожи. Отеки лица и ног. Увеличены периферические лимфоузлы. Суставы не изменены. Шум трения плевры и перикарда. Границы сердца расширены, тоны приглушенны, экстракардиальная. ЧСС 102 уд. в мин, артериальное давление (АД) 150/100 мм рт.ст. Печень и селезенка не увеличены.

Анализы крови. Нв – 72 г/л, Эр. – $3,1 \times 10^{12}/\text{л}$, Л. – $3,3 \times 10^9/\text{л}$, СОЭ 62 мм/час. Тромбоциты $90 \times 10^9/\text{л}$, С – реактивный белок (СРВ) +++, сиаловые кислоты 410 ед., серомукоид 380 ед., общий белок 51 г/л, а-гл. – 33%, у-гл. – 67%. Мочевина 15,7 ммоль/л, креатинин 0,3 ммоль/л, РФ – отр., LE-клетки 20 на 1000 лейкоцитов. ЦИК – 120 ед. АНФ титр 1:256. Анализ мочи: уд. вес. 1014, белок 3,1 г/л, эр. – 20-25 в п/зр, цилиндры 3-5-6 в п/зр.

У этой больной была зарегистрирована положительная РВ – +++, что сделало необходимым исключение сифилиса, но специфические трепонемные тесты были отрицательными. Это сделало правомочным заключение о наличии БЛГТРВ. При обследовании на наличие IgG-аКЛ и определении уровня КЛИГВЛ были получены следующие результаты: IgG-аКЛ – 19 GPL и КЛИГВЛ – 192,4 усл.ед.

Этот пример иллюстрирует возможное получение БЛГТРВ у больных СКВ без АФС. В данном случае методы регистрации КЛВА и аКЛ класса G оказались более специфичными в диагностике АФС.

Пример 3.

Больная Н., 18 лет. Жалобы на насильтственные движения в мышцах лица, туловища, правой руки, затруднение речи, выпадение волос, колющие боли в области сердца, боли в суставах. Около года назад после переохлаждения появились боли в суставах конечностей и насильтственные крупноразмашистые движения в правых конечностях, непроизвольно «гримасничала». Диагностировали малую хорею. Получала лечение преднизолоном, пенициллином, аспирином, через 1 месяц эти движения исчезли. Еще через 3 месяца без видимой причины впервые развился флегбогембоз глубоких вен правой голени. В июле 2002 года возникли боли в грудной клетке,

одышка, субфебрилитет. Лечилась в пульмонологическом отделении, а затем в отделении сосудистой хирургии по поводу флеботромбоза правой подколенной вены, осложнившейся тромбоэмболией ветвей легочной артерии и инфарктной пневмонией. В августе и сентябре 2002 года трижды повторились кратковременные (по 20-30 минут) эпизоды расстройства речи, онемения и слабости в правых конечностях. В августе 2003 года температура тела поднялась до 39°С, вновь появились боли в суставах. В 2004 г. был эпизод спонтанного аборта при сроке беременности 6 недель. Примерно 5 месяцев назад вновь забеременела. Беременность протекала с выраженным токсикозом и при сроке 18 недель диагностирована внутриутробная гибель плода и выкидыши.

Объективно. Гнездное выпадение волос на голове. Периферические лимфатические узлы диффузно увеличены. В легких везикулярное дыхание. Нижний край печени выходит из-под края реберной дуги на 3 см. Живот при пальпации мягкий и безболезненный. В неврологическом статусе – больная невротична, возбудима, говорит громко, быстро, как бы захлебываясь. Жалуется на раздражительность, слабость, плаксивость, плохой сон. Отмечаются непроизвольные, насилиственные типа гримас подергивания в правой половине лица, незначительный хореоатетоидный гиперкинез в кисти правой руки. Равномерное снижение мышечного тонуса в конечностях.

Анализы крови: Нв – 70 г/л, Эр. – $3,4 \times 10^{12}$ /л, Л. – $3,4 \times 10^9$ /л, СОЭ 60 мм/час, тромбоциты 90×10^9 /л, СРБ ++, сиаловые кислоты 410 ед., серомукоид 380 ед., общий белок 58 г/л, РФ отр., LE-клетки 20 на 1000 лейкоцитов.

ЭКГ – вариант нормы. Анализы мочи без патологии. ЭЭГ – выраженные общемозговые изменения. МРТ головного мозга – небольшое расширение левой сильвиевой щели.

Диагноз: АФС на фоне СКВ хронического течения, II степень активности, с поражением экстрапирамидной системы и хореоатетозными гиперкинезами, мигренеподобная головная боль, тромбоцитопения. Артрит, анемия, лимфаденопатия, алопеция.

У этой больной для подтверждения диагноза АФС были проведены РВ, определение IgG-аКЛ и КЛИГВЛ. Результат РВ оказался отрицательным. IgG-аКЛ оказались на уровне 20 GPL, так же не достигнув диагностически значимого уровня. Показатель КЛИГВЛ был зарегистрирован на уровне 241,9 усл.ед. Таким образом, только наличие специфических клинических симптомов и высокого уровня КЛИГВЛ позволили подтвердить диагноз АФС.

На основании вышеизложенного, можно заключить, что предложенный метод диагностики АФС при СКВ обладает высокими чувствительностью и специфичностью. Данный способ может быть применен, наряду с традиционными методами, в медицине, а именно в иммунологии и ревматологии, в частности, в диагностике АФС.

Формула изобретения

Способ иммунологической диагностики антифосфолипидного синдрома, включающий исследование реакции В-лимфоцитов, отличающийся тем, что из исследуемой венозной крови выделяют В-лимфоциты, инкубируют их с кардиолипином, вносят люминесцирующую сыворотку, конъюгированную с флюоресцеинизотиоционатом, регистрируют уровень флюоресценции и рассчитывают коэффициент кардиолипинзависимого синтеза иммуноглобулинов и при значении коэффициента равном 200 усл.ед. и более, определяют развитие антифосфолипидного синдрома.

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Усубакунова З.К.
Чекиров А.Ч.